

UJI FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI TANAMAN MERKUBUNG (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll) Mull. Arg.) DENGAN EKSTRAK TOTAL, FRAKSI n-HEKSANA, ETIL ASETAT DAN ETANOL AIR TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Azhar Seli Apriani, Chairul Saleh, Alimuddin

Program Studi Kimia FMIPA Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua Samarinda, 75123
Email: kotake.yoshio@yahoo.com

ABSTRACT

Phytochemical tests, mortality of larvae shrimp (brine shrimp lethality test) and the antibacterial activity of the leaf merkubung (*Macaranga gigantea* Rchb.f. & Zoll.) With various factions has been conducted. Merkubung leaf samples were extracted with ethanol and concentrated by using rotary evaporator. The total extract was fractionated with n-hexane and ethyl acetate. The results of phytochemical compounds secondary metabolites merkubung leaves showed that the total extract are contains alkaloids, phenolics and steroids. n-hexane fraction are containing alkaloids, flavonoids and steroids. Ethyl acetate faction are containing flavonoids and steroids. Ethanol-water faction is containing phenolic compounds. Shrimp larvae mortality trials showed mortality rates of larvae of *Artemia salina* (L) by using SAS Probit analysis to determine the value of Lethal Concentration 50 % (LC50). The test shows that the most toxic fraction is the total extract with LC50 values of 459.8414 ppm. The test of antibacterial activity using paper disc method and shows that the most active faction is the total extract with a MIC (Minimum Inhibitor Concentration) of 1 % is 6.5 mm diameter clear zone on *Staphylococcus aureus* (Gram positive) and 6.25 mm in the bacterium *Escherichia coli* (Gram negativ).

Keywords : *Macaranga gigantea* Rchb.f. & Zoll., phytochemical test, Antibacteria activity test, LC50.

A. PENDAHULUAN

Kasus infeksi masih menduduki tempat teratas penyebab kematian di negara berkembang, salah satunya adalah Indonesia. Terbukti dengan adanya data yang didapatkan dari WHO (World Health Organization) lebih dari 45% penyebab kematian di ASEAN berasal dari infeksi. Infeksi adalah penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari makhluk hidup ke makhluk hidup yang lain. Salah satu penyebab dari infeksi adalah bakteri.

Pengobatan terhadap infeksi pada umumnya digunakan antibiotik sintetis. Namun penggunaan antibiotik sintetis ini kadang-kadang memberikan efek samping terhadap tubuh yang tidak diinginkan^[1]. Hal itu membuat

masyarakat beralih pada obatan tradisional yang menggunakan bahan-bahan alami yaitu tumbuhan.

Merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull. Arg.) adalah salah satu tumbuhan yang dipergunakan sebagai obat tradisional. Tumbuhan ini digunakan sebagai obat diare di Malaysia^[2] dan juga beberapa penggunaan obat tradisional sebagai obat luka, dan batuk^[3].

Berdasarkan uraian di atas perlu dilakukan penelitian pada tumbuhan merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull.Arg.) mengenai skrining fitokimia, uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada berbagai fraksi.

B. METODOLOGI PENELITIAN

2.1. Alat

Blender, erlenmeyer, gelas beker, botol sampel, sloki, neraca analitik, pompa vakum, rotary evaporator, pipet tetes, tabung reaksi, pipet mikro 100-1000 µl, autoklaf, laminar flow, inkubator, hot plate, batang pengaduk, gelas ukur, cawan petri, jarum ose, bunsen, magnetic stirer, freezer, corong pisah, corong kaca, mistar, pinset dan lampu TL.

2.2. Bahan

Daun merkubung, etanol, n-heksana, akuades, etil aasetat, H₂SO₄, HCl, CH₃COOH anhidrat, H₂SO₄, FeCl₃, serbuk Mg, reagen dragendorff, DMSO, bacto agar, yeast, pepton, natrium klorida, aluminium foil, cling wrap, kertas

saring, telur udang, air laut, kloramfenikol (paper disc), bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

2.3. Prosedur Kerja

2.3.1. Ekstraksi

Sampel yang telah kering dan dihaluskan, diekstraksi dengan cara maserasi hingga tercapai kesetimbangan. Maserasi dilakukan dengan cara perendaman sampel dengan pelarut etanol pada suhu ruang. Filtrat yang diperoleh kemudian disaring dengan corong kaca

dan kertas saring untuk memisahkan ekstrak dari tumbuhan. Hasil ekstraksi selanjutnya dipekatkan dengan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak yang lebih pekat.

2.3.2. Fraksinasi

Dilakukan fraksinasi ekstrak kasar dengan menggunakan etanol dan n-heksana (1:1) sehingga diperoleh 2 fraksi yaitu fraksi etanol dan fraksi n-heksana. Fraksi n-heksana dipekatkan dengan rotary evaporator dan disebut sebagai ekstrak fraksi n-heksana.

Selanjutnya fraksi etanol difraksinasi dengan penambahan etil asetat. Dari fraksinasi kedua ini diperoleh 2 fraksi, yaitu fraksi etil asetat dan fraksi etanol. Kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator dan hasilnya disebut sebagai ekstrak fraksi etil asetat dan ekstrak fraksi etanol-air.

Pada ekstrak kasar etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder yang terkandung setiap fraksi dan ekstrak kasar. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri dan uji toksisitas (BSLT).

2.3.3. Uji Fitokimia

a. Uji Alkaloid (Uji Dragendorff)

Ekstrak ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff (campuran $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam asam nitrat dan larutan KI). Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat dengan pereaksi Dragendorff^[4].

b. Uji Terpenoid/Steroid

Ekstrak ditambahkan 3 tetes pereaksi Lieberman – Burchard (asam asetat + H_2SO_4). Uji positif terpenoid memberikan warna merah atau ungu dan uji positif steroid memberikan warna hijau atau biru^[5].

c. Uji Flavonoid

Ekstrak ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan 3 tetes HCl. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga^[5].

d. Uji Fenolik

Ekstrak kasar etanol daun merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull.Arg.) dan fraksi-fraksinya ditambahkan larutan besi(III) klorida (FeCl_3) 10% beberapa tetes, ekstrak positif mengandung fenolik apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam^[5].

2.3.4. Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Sebanyak 10 mg telur udang diambil dan ditambahkan dengan 100 mL air laut yang telah disaring. Selanjutnya diberi pencahayaan lampu TL agar menetas sempurna. Setelah 24-48 jam telur udang menetas dan siap untuk diuji^[6].

Sebanyak 0,2 gr ekstrak total ditimbang dan dilarutkan dengan air laut hingga volumenya mencapai 100 mL dalam labu ukur, untuk membuat konsentrasi sampel 2000 ppm. Sampel dengan konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; 31,2 ppm; 15,6 ppm dan 7,8 ppm dibuat dari pengenceran sampel dari konsentrasi 2000 ppm. Masing-masing sampel kemudian dipipet sebanyak 2500 μL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambah 2500 μL air laut yang berisi 10 larva udang pada setiap sampel sehingga volume sampel menjadi setengahnya (1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; 31,2 ppm; 15,6 ppm dan 7,8 ppm). Jumlah larva udang yang mati dihitung setelah 24 jam dan dianalisa

untuk menentukan nilai LC50. Kontrol dikerjakan sama dengan perlakuan sampel, tetapi tanpa penambahan ekstrak. Setiap sampel dilakukan uji mortalitas sebanyak tiga kali (triplo). Ekstrak fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air juga dilakukan uji mortalitas larva udang (brine shrimp lethality test) dengan prosedur yang sama seperti pada ekstrak total. Data yang diperoleh dimasukkan kedalam lembar pengamatan^[7].

2.3.5. Uji Aktifitas Antibakteri

Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* (bakteri gram positif) dan *Escherichia coli* (bakteri gram negatif). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan in vitro dengan menggunakan metode kertas cakram yang berdiameter 6 mm.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian aktivitas antibakteri ini disterilkan terlebih dahulu. Jarum ose dan pinset dibakar dengan pembakaran diatas api langsung dan peralatan gelas disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit^[8].

b. Pembuatan media Nutrien Agar (NA)

Sebanyak 23 gr NA disuspensikan dalam 1000 mL akuades kemudian dipanaskan hingga larut. Selanjutnya disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C^[9].

c. Regenerasi bakteri

Sebanyak satu sampai dua ose isolat dengan menggunakan jarum ose steril masing-masing dioleskan kedalam 10 mL media agar padat dalam tabung reaksi dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah didapat biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dalam media padat, bakteri dibiakkan kembali ke dalam media cair. Diambil satu sampai dua ose isolat bakteri dengan menggunakan jarum ose steril dan masing-masing diinokulasikan kedalam 50 mL media cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 34°C. Selanjutnya biakan bakteri dapat digunakan untuk uji aktivitas antibakteri^[10].

d. Uji Aktivitas Antibakteri

Pelaksanaan uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi agar (Kirby-Bauer). Sebanyak 15 mL nutrien agar dimasukkan kedalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Kemudian dimasukkan inokulum bakteri kedalam cawan petri yang berisi nutrien agar menggunakan lidi kapas steril. Inokulum bakteri dioleskan pada media agar dengan kemiringan cawan petri 90° secara terus menerus hingga merata^[11]. Setelah itu diletakkan kertas cakram (6 mm) pada permukaan media agar yang mengandung ekstrak uji. Sebagai kontrol positif pada masing-masing cawan petri dimasukkan kertas cakram yang mengandung kloramfenikol. Dan sebagai kontrol negatif dimasukkan kertas cakram tanpa penambahan ekstrak. Kemudian cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35-37°C.

e. Penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Ekstrak total dan fraksi-fraksi daun mara dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 1; 2; 4; 8 dan 16 % (b/v). Tiap konsentrasi kemudian diuji aktifitas antibakterinya dan hasilnya akan terlihat pada konsentrasi terendah dari

ekstrak yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri merupakan nilai MIC (*Minimum Inhibitory*

Concentration).

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji fitokimia terhadap ekstrak total, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol-air dari

daun Merakubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull. Arg.) diketahui kandungan jenis senyawa metabolit sekundernya yang diperlihatkan pada tabel berikut ini.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia dari ekstrak total dan masing-masing fraksi.

Jenis Senyawa	Jenis Ekstrak			
	Ekstrak total	Fraksi n-Heksana	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Etanol-Air
Alkaloid	+	+	–	–
Saponin	–	–	–	–
Steroid	+	+	+	–
Triterpenoid	–	–	–	–
Flavonoid	–	+	+	–
Fenolik	+	–	–	+

Keterangan: (+) : terdapat senyawa metabolit sekunder
(–) : tidak terdapat senyawa metabolit sekunder

Uji alkaloid dilakukan dengan menggunakan pereaksi Dragendroff yang menunjukkan hasil yang positif dengan terbentuknya endapan jingga sampai endapan merah coklat. Uji alkaloid pada sampel menunjukkan hasil positif pada Ekstrak total dan fraksi n-heksana.

Uji steroid dan triterpenoid dilakukan dengan menambahkan pereaksi Lieberman-Buchard (asam asetat anhidrida (CH_3COOH glasial dan H_2SO_4 pekat) pada semua ekstrak lalu dikocok dan dibiarkan beberapa menit. Apabila larutan menghasilkan warna hijau maka positif terdapat steroid dan positif triterpenoid apabila terbentuk larutan berwarna merah atau ungu. Uji steroid pada sampel menunjukkan hasil positif pada Ekstrak total, fraksi n-

heksana dan fraksi etil asetat. Uji triterpenoid menunjukkan hasil negatif.

Pada uji flavonoid, ekstrak dilarutkan dengan air panas, kemudian ditambah serbuk Mg dan HCl pekat lalu dikocok dan menunjukkan hasil positif apabila terbentuk warna merah, kuning atau jingga. Uji flavonoid pada sampel menghasilkan hasil positif pada fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat.

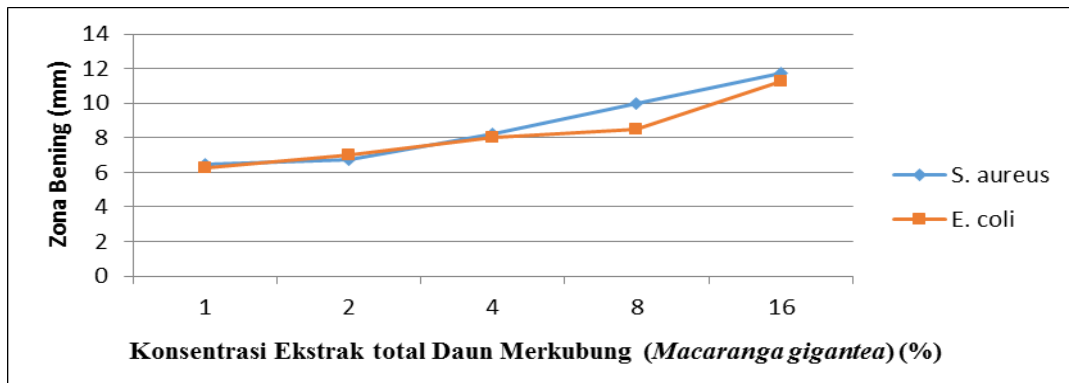
Uji fenolik dilakukan dengan menambahkan larutan FeCl_3 1% ke dalam ekstrak uji dengan hasil positif berwarna hijau kehitaman. Uji fenolik pada sampel menghasilkan hasil positif pada ekstrak total dan fraksi etanol-air.

Tabel 2. Nilai LC_{50} uji toksisitas larva udang ekstrak total dan masing-masing fraksi.

Jenis Ekstrak	LC_{50} (ppm)	Tingkat Toksik
Ekstrak Total	459,8414	Toksik
Fraksi n-heksana	596,1049	Toksik
Fraksi Etil Asetat	1651,0139	Tidak Toksik
Fraksi Etanol-Air	622,4436	Toksik

Berdasarkan hasil uji BSLT dari ekstrak total diperoleh nilai LC_{50} sebesar 459,8414 ppm; pada fraksi n-heksana diperoleh nilai LC_{50} 596,1049 ppm; pada fraksi etil asetat diperoleh nilai LC_{50} 1651,0139 ppm; pada fraksi etanol-air diperoleh LC_{50} 622,4436 ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut, ekstrak sampel mampu membunuh larva udang sampai 50% populasi.

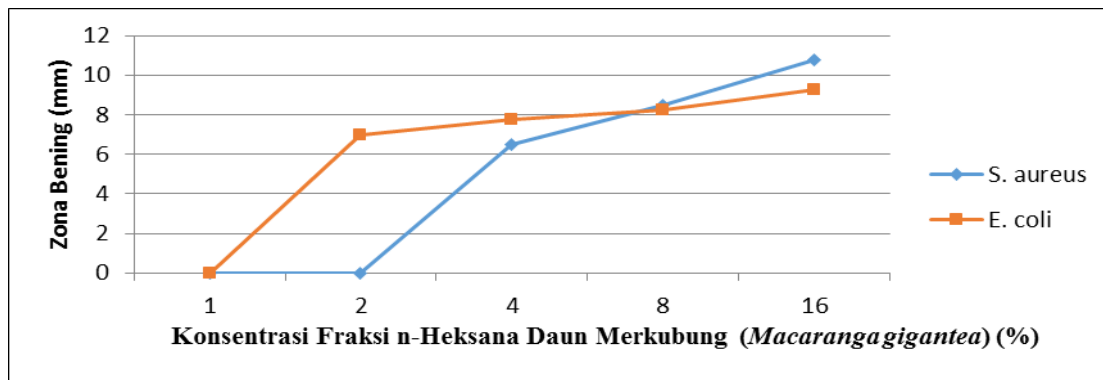
Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini adalah metode difusi agar dengan perlakuan kertas cakram 6 mm yang telah dijenuhkan dengan ekstrak uji kemudian ditempatkan pada permukaan media agar yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya dengan cara dioleskan yang selanjutnya diinkubasi. Dimana diameter zona bening di sekitar cakram merupakan aktivitas antibakteri atau daya hambat/daya bunuh ekstrak uji terhadap bakteri uji.



Gambar 1 Grafik daya hambat ekstrak terhadap variasi konsentrasi ekstrak total pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak total daun merkubung terlihat pada konsentrasi ekstrak 1% (b/v) dengan diameter zona bening 6,5 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 6,25 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 1%. Aktivitas antibakteri

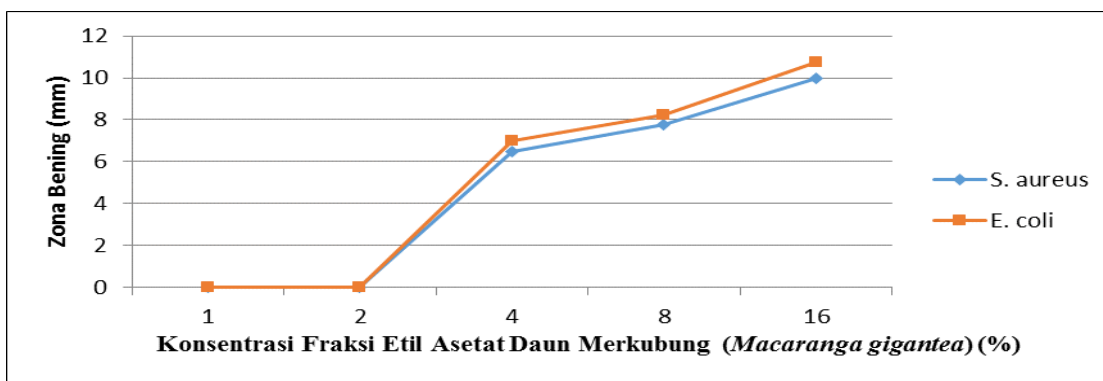
yang terlihat pada konsentrasi ekstrak 1% (b/v) menunjukkan bahwa nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dari ekstrak total daun merkubung berada diantara konsentrasi 1% (b/v).



Gambar 2 Grafik daya hambat ekstrak terhadap variasi konsentrasi fraksi n-heksana pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak fraksi n-heksana daun merkubung terlihat pada konsentrasi ekstrak 2% (b/v) dengan diameter zona bening 7 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* dan 6,5 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 4%. Aktivitas

antibakteri yang terlihat pada konsentrasi ekstrak 1% (b/v) dan 4% menunjukkan bahwa nilai MIC dari ekstrak fraksi n-heksana daun merkubung berada diantara konsentrasi 1-4% (b/v).



Gambar 3 Grafik daya hambat ekstrak terhadap variasi konsentrasi fraksi etil asetat pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Hasil uji aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat daun merkubung terlihat pada konsentrasi 4% dengan diameter zona bening 6,5 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 7 mm terhadap bakteri *Escherichia coli*. Aktivitas antibakteri yang terlihat pada konsentrasi ekstrak 4% (b/v) pada kedua bakteri tersebut menunjukkan bahwa nilai MIC (Minimum Inhibitory Concentration) dari fraksi etil asetat daun merkubung berada diantara konsentrasi 4% (b/v).

Pada ekstrak fraksi etanol-air daun merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. Zoll.) Mull.Arg.) tidak didapatkan zona bening sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat aktivitas antibakteri pada fraksi etanol-air baik pada bakteri *Escherichia coli* dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan dari analisa kekuatan menghambat bakteri dari ekstrak dan berbagai fraksi daun merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull.Arg.) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan bakteri *Staphylococcus aureus* maka dapat diketahui bahwa ekstrak total memiliki kekuatan hambat yang paling baik, hal ini dapat dilihat dari aktivitas antibakteri ekstrak total memiliki spektrum luas (dapat menghambat kedua jenis bakteri gram positif dan bakteri gram negatif) dan pada ekstrak total memiliki nilai MIC (Minimum Inhibitory Concentration) pada

konsentrasi 1% (b/v) dengan diameter zona bening 6,5 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 6,25 mm terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Aktivitas antibakteri yang terlihat pada konsentrasi ekstrak 1% (b/v) menunjukkan bahwa nilai MIC (Minimum Inhibitory Concentration) dari ekstrak total daun merkubung berada diantara konsentrasi 1% (b/v) dimana sudah memiliki kekuatan hambat yang dikategorikan kuat. Hal ini juga dimungkinkan pada ekstrak total memiliki banyak kandungan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri sehingga kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri lebih kuat daripada fraksi lainnya.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri yang diperoleh dapat dikatakan bahwa ekstrak dan masing-masing fraksi dari daun merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull.Arg.) masih kurang efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* karena tidak ada aktivitas dari ekstrak yang memiliki aktivitas lebih besar dari aktivitas antibakteri kloramfenikol yaitu 28,5 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan 23 mm pada bakteri *Escherichia coli*. Namun ekstrak total, fraksi n-heksana, dan etil asetat dari daun merkubung tetap dapat dianggap berpotensi sebagai antibakteri.

D. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak total dari daun merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull.Arg.) adalah alkaloid, steroid dan fenolik. Fraksi n-heksana mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan steroid. Fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid dan steroid. Fraksi etanol-air mengandung senyawa fenolik.

2. Hasil uji antibakteri diperoleh fraksi yang paling aktif yaitu ekstrak total dimana pada Konsentrasi minimum 1% menghasilkan diameter zona bening 6,5 mm pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan diameter zona bening 6,25 mm pada bakteri *Escherichia coli*.
3. Hasil uji mortalitas larva udang (brine shrimp lethality test) daun merkubung (*Macaranga gigantea* (Rchb.f. & Zoll.) Mull. Arg.) diperoleh hasil bahwa ekstrak total merupakan yang paling aktif dengan nilai LC50 sebesar 459,8414.

DAFTAR PUSTAKA

1. Aliero, A.A., Aliero, B.L., and Buhari, U. 2008. Preliminary Phytochemical and Antibacterial Screening of *Scadoxus multiflorus*, International Journal of Pure and Applied Science, vol. 4, pp. 13-17.
2. Susanto, D. 2012. Tahapan Perkembangan Bunga dan Buah Mahang (*Macaranga Gigantea* (Rchb.f.& Zoll) Mull. Arg.). Samarinda: Mulawarman Scientifitie.
3. Heyne, 1987. Tumbuhan Berguna Indonesia. Badan Litbang Kehutanan, Jakarta. Hal. 1767- 1775. Dwijoseputro.
4. Robinson, T. 1995. Kandungan Kimia Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi. Bandung: Penerbit ITB.
5. Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Bandung: Penerbit ITB.
6. Nurhayati, A.P.D. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. Akta Kimindo Vol. 2.
7. Meyer, B. N, N.R. Ferrigni, J.E. Putman, L.B. Jacobsen, D.E. Nichol dan J.L. Melaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Vonvenient General Bioassay for Avtive Plant Constituents. *Planta Medica* 45:31-34.
8. Bilbiana, I. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta : PT Raja .
9. Gowri, S.S and Vasantha K. 2009. Solvent Based Effectiveness of Antibacterial and Phytochemical Derivatized From The Seeds of *Harpulliaarborea* (Blanco) Radlk (Sapindaceae). PG & Reasearch Departement of Botany : Kongunado Art and Science Collage. Vol 13(4) 99-101.
10. Mayanti, T., Julaha E. dan Putri A. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang *Lansium Domesticum* Corr. Cv Kokossan. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran.
11. Mahato, R. B and Chaudhary, R.P. 2005. Ethnomedicinal Study and Antibacterial Activities of Selected Plants Palpa District, Nepal. Department of Botany : Tribhuvan University. Scientific World. Vol 3 No 3.